

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**Μελέτη της επίδρασης του μυκητοκτόνου Iprodione και των προϊόντων
μεταβολισμού του στην αφθονία και λειτουργία των νιτρωδοποιητικών
μικροοργανισμών του εδάφους**

**Παπαδημητρίου Φιλοθέη
Χημικός**

Μελέτη της επίδρασης του μυκητοκτόνου Iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού του στην αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους

Study of the impact of Iprodione and its metabolites on soil nitrification and on the abundance and function of ammonia oxidizing mictobes in soil

Επιβλέπων: Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας

Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Με το τέλος του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Καρπούζα Δημήτρη, Αναπληρωτή Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική αυτή εργασία, για την βοήθειά του και την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκειά της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα την κα. Τουρνά Μαρία, μεταδιδακτορική ερευνήτρια, για την συνεχή και αμέριστη βοήθειά της σε όλα τα στάδια της εργασίας αυτής, για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου και την πολύ όμορφη συνεργασία όλους αυτούς τους μήνες. Ευχαριστώ πολύ και την κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, καθώς και τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία καθώς και τους κ. Καρα Παναγιώτη, διδακτορικός ερευνήτης, κα. Παπαδοπούλου Ευαγγελία μεταδιδακτορική ερευνήτρια για την ενθάρρυνση και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια και ειδικότερα την αδερφή μου για τη δύναμη και τη βοήθεια που μου έδωσαν.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. 1 Iprodione	8
1.1.1 Μετασχηματισμός του Iprodione σε διάλυμα	9
1.1.2 Μετασχηματισμός του Iprodione σε έδαφος	10
1.2 Ο κύκλος του αζώτου	12
1.3 Νιτροποίηση και νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί	14
1.3.1 Νιτροδοποιητικά βακτήρια (AOB)	15
1.3.2 Νιτροδοποιητικά Αρχαία (AOA)	16
1.4 Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς	17
2. ΣΚΟΠΟΣ	18
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
3.1. Έδαφος	20
3.2. Iprodione και μεταβολίτες	20
3.3. Προετοιμασία πειράματος μικροκόσμων	21
3.4. Προσδιορισμός επιπέδων NH₃, NO₂⁻ και NO₃⁻ στο έδαφος	21
3.4.1. Εκχύλιση NH ₃ , NO ₂ ⁻ και NO ₃ ⁻ στο έδαφος	22
3.4.2. Προσδιορισμός NO ₂ ⁻ και NO ₃ ⁻ .	22
3.4.3. Προσδιορισμός NH ₃ .	22
3.5. Προσδιορισμός υπολειμμάτων iprodione και προϊόντων μεταβολισμού του στο έδαφος	23
3.5.1. Εκχύλιση Iprodione και προϊόντων μεταβολισμού από το έδαφος	23
3.5.2. Μέθοδος ανάλυσης iprodione και προϊόντων μεταβολισμού	23
3.5.3. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς	23
3.6. Μοριακές αναλύσεις	23
3.3.5. Εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους (0.5 g)	23
3.3.6. Προσδιορισμός των αντιγράφων του γονιδίου amoA των AOA και AOB σε δείγματα εδάφους με την χρήση PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR)	23
3.7. Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων	25
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
4.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός του iprodione στο έδαφος	27
4.2. Η επίδραση του iprodione στις συγκεντρώσεις αμμωνιακών στο έδαφος	29
4.3. Η επίδραση του iprodione στις συγκεντρώσεις νιτρικών στο έδαφος	30

4.4. Η επίδραση του iprodione στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στο έδαφος	31
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	32
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Νιτροποίηση ονομάζεται η μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων ή αμμωνίας αρχικά σε νιτρώδη και στην συνέχεια σε νιτρικά. Η διεργασία πραγματοποιείται σε δύο βήματα: Στο πρώτο στάδιο η αμμωνία (NH_3) μετατρέπεται σε νιτρώδη (NO_2^-) με ενδιάμεση παραγωγή υδροξυλαμίνης (NH_2OH) από Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB) και Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA). Στο δεύτερο στάδιο τα νιτρώδη ιόντα μετατρέπονται σε νιτρικά (NO_3^-) από νιτρικοποιητικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Nitrobacter* και *Nitrospira*. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα AOA και AOB εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία στα γεωργικά φάρμακα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την εμφάνιση τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του μυκητοκτόνου iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού του στο έδαφος, παρουσία ή απουσία αζωτούχου λίπανσης, στην αφθονία και λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Η υπόθεση που μελετήθηκε ήταν ότι η προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης στο έδαφος πριν την προσθήκη iprodione θα οδηγούσε σε αύξηση των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών μεγιστοποιώντας την επίδραση του iprodione σε αυτούς. Για την διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης πραγματοποιήθηκε πείραμα εργαστηριακής κλίμακας όπου σε δείγματα εδάφους, που είχαν δεχτεί ή όχι αμμωνιακή λίπανση, εφαρμόστηκαν αυξανόμενες δόσεις του μυκητοκτόνου iprodione (0, x1, x10, x100 της συνιστώμενης δόσης). Ακολούθως μελετήθηκε η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του iprodione μέσω HPLC-PDA και η αφθονία και η λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών μέσω q-PCR και προσδιορισμού των επιπέδων NH_4 και NO_3 . Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι απουσία του iprodione, η προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης οδήγησε στην αύξηση του ρυθμού νιτροποίησης σε σχέση με τα δείγματα εδάφους που δεν εμπλουτίστηκαν με επιπλέον αμμωνιακά ιόντα. Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η αρχική αφθονία των AOA στα δείγματα του εδάφους ήταν πολύ υψηλότερη από την αντίστοιχη αφθονία των AOB. Η αποδόμηση του μυκητοκτόνου πραγματοποιήθηκε στις 56 ημέρες του πειράματος, με ταυτόχρονη παραγωγή χαμηλών συγκεντρώσεων 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA). Η υπολειμματικότητα του iprodione στο έδαφος επηρεάστηκε από την δόση εφαρμογής με τις υψηλότερες τιμές DT50 να καταγράφονται στα δείγματα που δέχτηκαν την υψηλότερη δόση του μυκητοκτόνου (x100). Αντίστοιχα η αμμωνιακή λίπανση προκάλεσε μια επιβράδυνση της αποδόμησης του iprodione στις δόσεις x10 και x100. . Συνολικά η προσθήκη iprodione σε κανένα επίπεδο συγκέντρωσης και ανεξάρτητα από την παρουσία N λίπανσης δεν οδήγησε σε μείωση της αφθονίας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών αλλά ούτε και ανασχεση της λειτουργίας τους. Η περιορισμένη αυτή ανασταλτική επίδραση του iprodione στην παρούσα μελέτη είναι πιθανό να οφείλεται στο σχηματισμό χαμηλών συγκεντρώσεων του 3,5- DCA. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην απευθείας αξιολόγηση της τοξικότητας του 3,5-DCA στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς.

ABSTRACT

Nitrification is the microbial conversion of ammonia or ammonium ions to nitrite and finally to nitrate. The nitrification process is modular and it consists of two steps: In the first step NH_3 is converted to nitrite NO_2^- through the intermediate formation of hydroxylamine (NH_2OH) by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing Archaea (AOA). In the second step the nitrite ions are converted to nitrate (NO_3^-) by the nitrite - oxidizing bacteria (NOB) of the genera *Nitrobacter* and *Nitrospira*. Previous studies have indicated the sensitivity of AOA and AOB to pesticides and their use as potential indicators of the soil microbial ecotoxicity of pesticides has been proposed. In the present study the effect of the fungicide iprodione and its transformation products, in the presence or absence of ammonium fertilization, on the abundance and function of AOA and AOB was examined. Our hypothesis was that the addition of ammonium fertilization in soil just prior to pesticide application will induce growth of ammonia-oxidizing microorganisms making them more vulnerable to external stress and thus maximizing the effects of the pesticides or its transformation products. To explore the above hypothesis a soil lab microcosm study was employed where soil samples were treated with increasing dose rates of iprodione (x0, x1, x10 and x100 the recommended dose). The dissipation and metabolism of iprodione was determined by HPLC-PDA while the impact of iprodione on the abundance and activity of ammonia oxidation microorganisms was determined by q-PCR measurement of the abundance of the *amoA* gene and through measurements of NO_3^- , NH_3 levels. Our results showed that in soil samples which did not receive any pesticide application there was a clear dominance of AOA over AOB and also the application of ammonium significantly accelerated the rate of nitrification in soil. The dissipation of iprodione was relatively rapid and it was affected both by the dose rate and the ammonium prior application. Thus a slower dissipation of iprodione was observed with increasing dose rates and in the soil samples amended with ammonium prior to pesticide addition. The latter effect was only evident in the x10 and x100 dose rates only. Dissipation of iprodione was coupled with the formation of low amounts of its main hydrolysis product, 3,5-dichloroaniline (3,5-DCA) which did not hydrolyze further. Iprodione or its metabolic products, formed at low amounts, did not impose any effect on the abundance and activity of ammonia-oxidizing microorganisms. The lack of effects of iprodione on AOA and AOB abundance and function might be explained by the low amounts of 3,5-DCA formed during the study. Follow up studies will explore directly the impact of 3,5-DCA on the soil nitrifiers.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Iprodione

Το iprodione (3 - (3,5 δίχλωρο-φαίνυλ)- N -ισοπρόπυλ- 2,4 διοξιμιδαζόλιο I- καρβοξαμίδιο) είναι ένα ευρέως φάσματος μυκητοκτόνο γνωστό στην αγορά με το εμπορικό όνομα Rovral®. Ανήκει στη χημική οικογένεια των δικαρβοξαμιδίων και συντέθηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του '90. Αποτελείται από έναν δακτύλιο ιμιδαζολίου ενωμένο με ένα 3,5 δίχλωρο- φαινυλαμίδιο (Pospíšet al, 1999) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Η χημική δομή του iprodione

Το iprodione χρησιμοποιείται για την πρόληψη της βλάστησης των σπόρων των μυκήτων σε διάφορες καλλιέργειες καθώς και σε χλοοτάπητες. Προστατεύει τις καλλιέργειες από ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες όπως *Botrytis cinerea*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* και *Sclerotinia sp.*, (Minambres et al., 2010, Grabke et al., 2014). Πρόσφατα προτάθηκε η χρήση του iprodione, με το εμπορικό όνομα Enclosure, και ως νηματοδοκτόνο χωρίς όμως η χρήση του αυτή να είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην αγροτική πρακτική (Wick et al, 2009).

Ο οργανισμός USEPA το 1998 χαρακτήρισε το iprodione ως πιθανόν καρκινογόνο για τον άνθρωπο ενώ σύμφωνα με έρευνα των Blystone et al., (2007) το iprodione μείωσε την παραγωγή

τεστοστερόνης στα ποντίκια με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους. Επίσης ύστερα από χορήγηση iprodione (ως 90mg/kg) σε σκύλους καθημερινώς επί ένα χρόνο, παρατηρήθηκε αύξηση βάρους στο συκώτι, στο πάγκρεας, στον πνεύμονα και αλλαγές στο αριθμό των ερυθρών κυττάρων (National Library of Medicine, 1992). Το iprodione είναι ελαφρώς τοξικό για τα υδρόβια πτηνά και τα ψάρια, ενώ δεν είναι καθόλου τοξικό για τα φυτά (Charles 1991). Προσροφάται μετρίως ισχυρά στο έδαφος με K_{oc} 400 ml/g (Stromqvist et al, 2005), τιμή που παραπέμπει σε ουσία σχετικά κινητική στο έδαφος και στο περιβάλλον ενώ υπολείμματα του έχουν βρεθεί σε επιφανειακά ύδατα (Ludvigsen et al, 2004).

Ο χρόνος ημιζωής του iprodione στο έδαφος κυμαίνεται μεταξύ 20 και 160 ημερών (The Agrochemicals Handbook. 1991). Η εμμόνη του iprodione στο έδαφος ποικίλει ανάλογα με την οξύτητα του εδάφους, την περιεκτικότητά του σε άργιλο και με το ιστορικό εφαρμογής γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος. Για παράδειγμα η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του iprodione στο ίδιο έδαφος οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιολογικής αποτελεσματικότητάς λόγω εμφάνισης του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης κυρίως σε ουδέτερα προς αλκαλικά εδάφη (Martin et al., 1991). Το pH παίζει σημαντικό ρόλο στη εμμόνη του iprodione στο έδαφος. Συγκεκριμένα σε αλκαλικά εδάφη παρατηρήθηκαν αυξημένοι ρυθμοί αποδόμησης του μυκητοκτόνου από τους μικροοργανισμούς του εδάφους και κυρίως τα βακτήρια που ευνοούνται σε αλκαλικό περιβάλλον (Walker, 1987).

Ο μηχανισμός δράσης του iprodione περιλαμβάνει την αναστόλη της σύνθεσης του DNA και του RNA κατά την εκβλάστηση των σπόρων του μύκητα. Επιπλέον, αναστέλλει το ένζυμο NADH κυτόχρωμα c αναγωγή εμποδίζοντας έτσι την λιπιδική και μεμβρανική σύνθεση με αποτέλεσμα να μην αναπτύσσεται το μυκήλιο (Edlich et al, 1987, 1992). Ο Julliard το 1994 ύστερα από πειράματα συμπέρανε ότι ο πρώτος στόχος του iprodione είναι το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση το οποίο καταλύει την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την σύνθεση του ασκορβικού οξέος μέσω της UDP- γλυκόζης.

1.1.1. Μετασχηματισμός του iprodione σε διάλυμα.

Το μόριο της N-[(3,5-διχλωροανιλino) καρβονυλ] -N - [(ισοπροπυλαμινο) καρβονυλ] γλυκίνης κυκλοποιείται ποσοτικά και μη αντιστρεπτά στους 50°C σε εύρος pH 0,5-6 με δύο παράλληλες διαδρομές για να δώσει το iprodione και το ισομερές του (Belafdal et al, 1989). Σε αιθανολικό διάλυμα, το iprodione αναδιατάσσεται προς το ισομερές του [N- (3,5-διχλωροφαινυλ) -3-ισοπρόπυλο-2,4-διοξυ-L- ημιδαζολιδινεκαρβοξαμίδιο), το οποίο είναι ένα πολύ χαμηλότερης

δραστικότητας μυκητοκτόνο. Η αντίδραση αυτή συμπεριλαμβάνει τον σχηματισμό του ενδιάμεσου 3 (ισοπρόπυλ-καρβαμόνυλ)-5-(3,5- διχλωροφαινυλ-1) υδαντοϊκού οξέος. Η βιομηχανική σύνθεση του iprodione περιλαμβάνει την μετατροπή σε ισχυρά αλκαλικά διαλύματα, του ισομερούς σε υδαντοϊκό οξύ το οποίο στη συνέχεια κυκλοποιείται σε όξινο περιβάλλον και παράγεται το iprodione. Το 1989 ο Belafdal και οι συνεργάτες του πρότειναν δυο μηχανισμούς σύνθεσης του iprodione. Στον πρώτο μονοπάτι, η ένωση N-[(3,5-διχλωροανιλίνο) καρβονυλ] -N - [(ισοπροπυλαμινο) καρβονυλ] γλυκίνη μέσω κατάλυσης μετατρέπεται στο ενολικό ανιόν της. Παρουσία οξέος αποβάλλεται ένα μόριο υδροξυλίου, ένα μόριο iprodione και ένα μόριο ύδατος. Στο δεύτερο μονοπάτι το N₂ προσβάλλει το καρβοξύλιο σχηματίζοντας το ενδιάμεσο προϊόν το οποίο στη συνέχεια δίνει ένα μόριο iprodione και ένα μόριο υδροξυλίου.

1.1.2. Μετασχηματισμός του Iprodione στο έδαφος.

Η μικροβιακή αποδόμηση αποτελεί την βασικότερη διεργασία με την οποία τα γεωργικά φάρμακα απομακρύνονται από το έδαφος και γενικότερα από το περιβάλλον (Kaufman, 1987). Η πρώτη προσπάθεια μελέτης μετασχηματισμού του iprodione πραγματοποιήθηκε από τον Walker (1987). Οι συγκεκριμένες μελέτες έδειξαν την 3,5 διχλωροανιλίνη (3,5-DCA) ως τελικό μεταβολικό προϊόν από την αποδόμηση του iprodione στο έδαφος χωρίς όμως να μπορέσει να προσδιορίσει τον ενδιάμεσο μεταβολίτη. Η υδρόλυση του iprodione σε 3,5-DCA αποτέλεσε τη βάση για την κατασκευή ενός χρωματομετρικού τεστ ώστε να διαπιστώνεται η ταχύτητα υδρόλυσης του iprodione σε εδάφη με ιστορικό χρήσης iprodione και κατά συνέπεια η επιβεβαίωση της εμφάνισης επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης (Martin et al., 1986; Slade et al., 1992

Η Athiel και η ομάδα της το 1995 κατάφερε να απομονώσει ένα βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter* sp. από αγροτικό έδαφος με ιστορικό χρήσης iprodione το οποίο είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα iprodione. Το στέλεχος αυτό ήταν ικανό να χρησιμοποιεί το iprodione ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος βρέθηκε να μεταβολίζει το iprodione μέσω διαδοχικών βημάτων όπου παράγονταν ως ενδιάμεσα προϊόντα τα 3,5 - διχλωροφαινυλκαρβοξυμίδιο (met I) και 3,5-διχλωροφαινυλουρία-οξικό οξύ (met II) με το τελευταίο να υδρολύεται προς 3,5-DCA ως τελικό προϊόν. Ο met I σχηματίζεται με απομάκρυνση της λειτουργικής ομάδας της ουρίας από το μόριο του iprodione και στην συνέχεια μέσω κυρίως αβιοτικών διεργασιών μετατρέπεται σε met II.

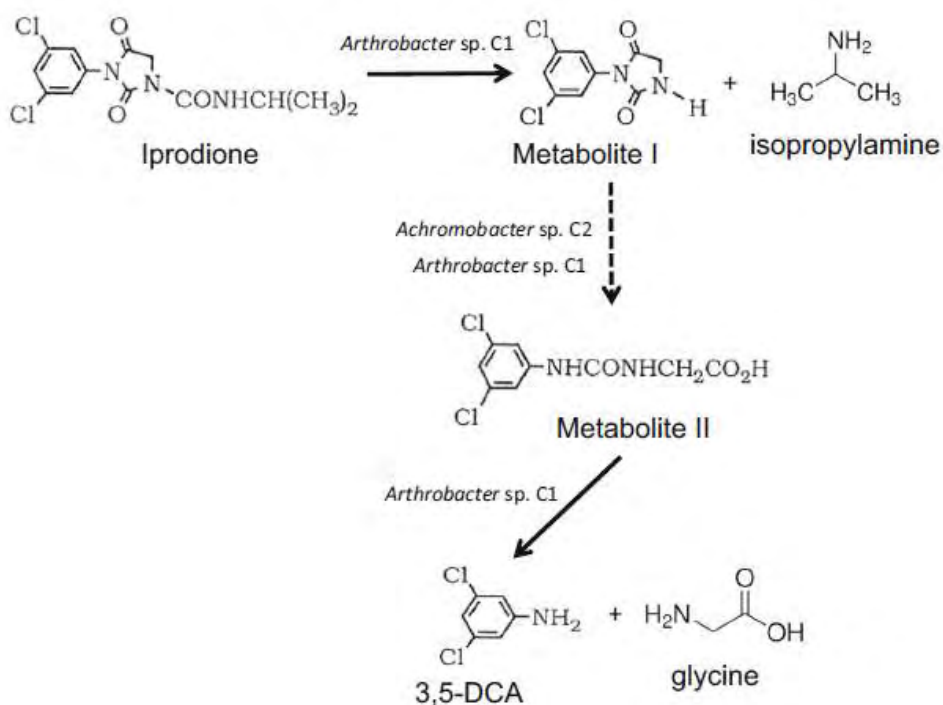
Όπως προαναφέρθηκε σε εδάφη με ιστορικό εφαρμογής iprodione εμφανίστηκε το φαινόμενο της

επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του iprodione (Martin et al., 1990, Walker et al., 1990). Πειράματα σε δείγματα εδάφους χωρίς ιστορικό εφαρμογής του iprodione τα οποία όμως είχαν πρότερα εμβολιαστεί με το βακτήριο *Arthrobacter* sp. έδειξαν ταχεία αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου. Σε δείγματα εδάφους χωρίς ιστορικό εφαρμογής iprodione βρέθηκε ότι το μυκητοκτόνο μεταβολίζεται βιοτικά ή αβιοτικά ακολουθώντας διαφορετικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή διαφορετικών προϊόντων (Athiel et al, 1995). Έτσι σε δείγματα εδάφους με ιστορικό εφαρμογής iprodione και σε δείγματα χωρίς ιστορικό αλλά που είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακό στέλεχος *Arthrobacter* sp που έχει την δυνατότητα να μεταβολίζει το iprodione, ο met I μετατρέπεται αμέσως σε met II και αυτός στην συνέχεια σε 3,5-DCA.

Τρία βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από εδάφη προσαρμοσμένα στην ταχύτατη αποδόμηση του iprodione: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp. και *Pseudomonas paucimobilis*. Οι δύο πρώτοι μικροοργανισμοί βρέθηκε ότι ήταν υπεύθυνοι για το μετασχηματισμό του iprodione σε met I και έπειτα σε met II. Ακολούθως το βακτηριακό στέλεχος *P. paucimobilis* διασπά τον met II σε 3,5 διχλωροανιλίνη (3,5 D) (Mercadier et al, 1997). Τα βακτηριακά στελέχη *Arthrobacter* sp και *Pseudomonas* sp. παρά το ότι ανήκουν σε φυλογενετικά διακριτά βακτηριακά γένη και είδη έχουν την ικανότητα να αποδομούν το iprodione γεγονός που σημαίνει πως ίσως κατέχουν παρόμοιο γενετικό υλικό που εμπλέκεται στην αποδόμηση του iprodione.

Σε μία παρόμοια μελέτη οι Campos et al., (2015) απομόνωσαν μια βακτηριακή καλλιέργεια που αποδομούσε ταχύτατα το iprodione. Η συγκεκριμένη καλλιέργεια αποτελούνταν από δύο βακτηριακά στελέχη, ένα *Arthrobacter* sp. που ονομάστηκε στέλεχος C1 και ένα *Achromobacter* που ονομάστηκε στέλεχος C2. Το πρώτο στέλεχος C1 ταυτοποιήθηκε ως το κλειδί-διάσπασης του iprodione και παρατηρήθηκε ότι διασπά το iprodione μέσω του σχηματισμού της ισοπροπυλαμίνης, χρησιμοποιώντας την ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Σε pH 7.5 και θερμοκρασία 35–°C το συγκεκριμένο στέλεχος φτάνει στο μέγιστο της απόδοσής του. Το δεύτερο βακτηριακό στέλεχος μετασχηματίζει το iprodione μόνο παρουσία εναλλακτικής θρεπτικής πηγής άνθρακα και αζώτου και χωρίς τον σχηματισμό της ισοπροπυλαμίνης. Περαιτέρω μελέτες από τους Campos et al. (2017) μελέτησαν σε βάθος το μεταβολικό μονοπάτι του iprodione από τα παραπάνω βακτηριακά στελέχη εκθέτοντάς τα σε διαφορετικές θρεπτικές συνθήκες. Έτσι παρατηρήθηκε ότι το μεταβολικό μονοπάτι είναι το ίδιο με αυτό που είχε αναφερθεί από τους Athiel et al., (1995) και παρουσιάζεται στην Εικόνα 2: Έτσι το iprodione υδρολύεται σε ισοπροπυλαμίνη και met I ο οποίος στην συνέχεια μετατρέπεται σε μεταβολίτη II που με την σειρά του υδρολύεται σε 3,5-DCA. Το στέλεχος C1 φαίνεται ότι είχε την ικανότητα να υδρολύει ταχύτατα τα iprodione και metII και να χρησιμοποιεί τα προϊόντα μεταβολισμού (ισοπροπυλαμίνη και γλυκίνη αντίστοιχα) ως πηγή C και N για την αύξηση και ανάπτυξη τους ενώ αντίθετα δεν μπορούσε να μεταβολίσει το met I του οποίου η

μετατροπή σε metII απαιτούσε την προσθήκη επιπλέον θρεπτικών στοιχείων. Αντίθετα το στέλεχος C2 είχε την ικανότητα να μεταβολίζει το iprodione και τα ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού του μόνο συμμεταβολικά δηλ, παρουσία επιπλέον θρεπτικών στοιχείων. Συμπερασματικά η μικροβιακή διάσπαση του μεταβολίτη I σε μεταβολίτη II φαίνεται να είναι το ρυθμοκαθοριστικό βήμα του μικροβιακού μεταβολικού μονοπατιού αποδόμησης του iprodione (Campos et al., 2017).

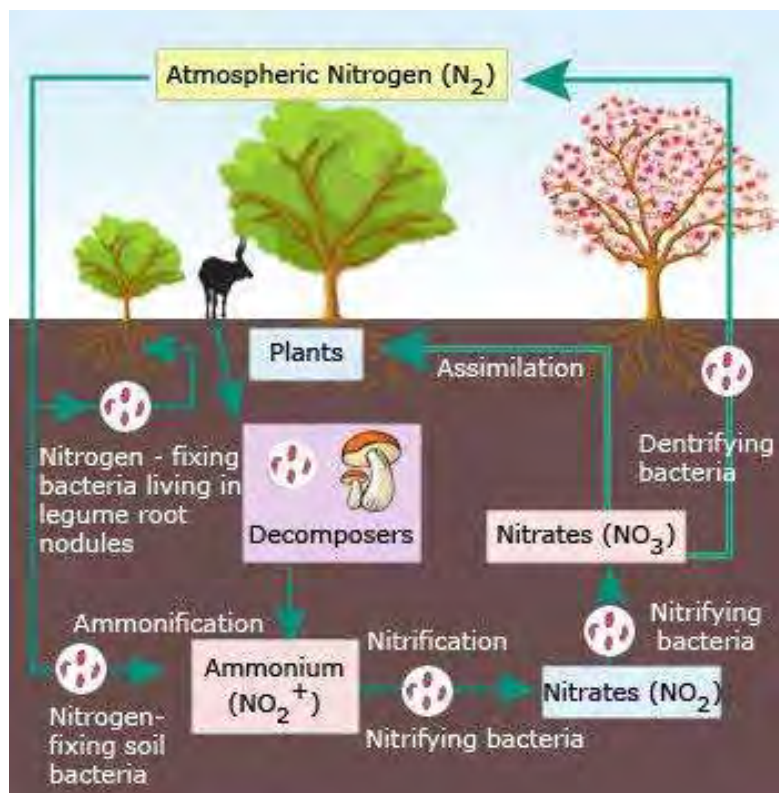


Εικόνα 2. Το μικροβιακό μονοπάτι μεταβολισμού το iprodione από τα βακτηριακά στελέχη C1 και C2 όπως έχει περιγραφεί από τους Campos et al. (2017)

1.2. Ο κύκλος του αζώτου

Ο κύκλος του αζώτου είναι σχεδόν τέλειος κύκλος και έχει μελετηθεί πολύ λόγω της μεγάλης του σημασίας για την φυτική παραγωγή. Αν και οι οργανισμοί ζουν σε μια πλούσια σε άζωτο ατμόσφαιρα (79%), ελάχιστοι μικροοργανισμοί μπορούν να δεσμεύουν απευθείας το ατμοσφαιρικό άζωτο. Κατά τον μεταβολισμό και την αποδόμηση των οργανισμών, ελάχιστο άζωτο εκλύεται με αέρια μορφή. Ακόμη, ο ρόλος του βιοτικού παράγοντα στην ανακύκλωση του αζώτου είναι όχι μόνο πολυπλοκότερος αλλά και περισσότερο εκτεταμένος και εξειδικευμένος. Μεγαλύτερη εξειδίκευση σημαίνει ότι μερικοί οργανισμοί δρουν μόνο σε ορισμένες φάσεις του κύκλου. Μια συνοπτική εικόνα του κύκλου του αζώτου δίνεται στην Εικόνα 3. Από το παρακάτω σχήμα προκύπτει ότι ο κύκλος του αζώτου πραγματοποιείται σε 4 κύρια βήματα στα οποία συμμετέχουν διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών: (α) Αζωτοδέσμευση (β) Ανοργανοποίηση (γ) Νιτροποίηση

και (δ) Απονιτροποίηση.



Εικόνα 3. Γραφική απεικόνιση του κύκλου του αζώτου

Η ανθρώπινη δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα διπλασίασε το ποσοστό της εισόδου του αζώτου στο χερσαίο κύκλο του και αυτό το ποσοστό αυξάνεται συνεχώς (Vitousek et al., 1997). Οι συνέπειες μπορεί να είναι δραματικές και περιλαμβάνουν αυξημένες συγκεντρώσεις του μονοξειδίου του αζώτου των αερίων του θερμοκηπίου (N_2O), απώλειες θρεπτικών συστατικών όπως το ασβέστιο και κάλιο από το έδαφος, οξίνιση των εδαφών και των λιμνών και ευτροφισμό του γλυκού νερού (Vitousek et al., 1997). Επιπλέον, έχει προβλεφθεί (Tilman et al., 2001), πως η αύξηση της εισόδου του αζώτου κατά τη διάρκεια των επόμενων 50 ετών μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της βιοποικιλότητας και αλλαγές στη σύνθεση των ειδών στα επίγεια και στα υδάτινα οικοσυστήματα. Η κατανόηση της φυσιολογίας και του οικολογικού ρόλου των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στα στάδια μετατροπής του αζώτου καθώς και η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των κοινοτήτων τους, είναι μέρος μιας ευρύτερης προσπάθειας κατανόησης των επιπτώσεων που θα έχει η παγκόσμια αλλαγή στην ζωή πάνω στη γη.

1.3. Νιτροποίηση και νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί

Νιτροποίηση ονομάζεται η μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρικά και νιτρώδη. Όπως προαναφέρθηκε η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο βήματα: Στο πρώτο στάδιο, που ονομάζεται και στάδιο Νιτρωδοποίησης, η αμμωνία (NH_3) μετατρέπεται σε νιτρώδη (NO_2^-) με ενδιάμεση παραγωγή υδροξυλαμίνης (NH_2OH) από νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) και αρχαία (AOA) (αντίδραση 1 και 2) (Hatzenpichler., 2012; Treusch et al., 2005). Στο δεύτερο στάδιο, που ονομάζεται και στάδιο της νιτριοποίησης, τα νιτρώδη ιόντα μετατρέπονται σε νιτρικά (NO_3^-) από νιτριοποιητικά βακτήρια του γένους *Nitrobacter* και *Nitrospira* (αντίδραση 3). Η θεωρία των διακεκριμένων ρόλων μεταξύ των μικροβιακών ομάδων που συμμετέχουν στα διακριτά βήματα της νιτροποίησης καταρρίφθηκε από τους Daims et al. (2015) και Van Kessel et al. (2015) που ανέφεραν για πρώτη φορά την απομόνωση βακτηρίων του γένους *Nitrospira* (δηλαδή φυλογενετικά χαρακτηρισμένα ως νιτριοποιητικά βακτήρια) που είχαν την ικανότητα να πραγματοποιούν όλα τα βήματα της νιτροποίησης, δηλαδή νιτρωδοποίηση και νιτριοποίηση. Τα συγκεκριμένα βακτήρια ονομάστηκαν Comammox (complete ammonia oxidation) και ο οικολογικός τους ρόλος στην νιτροποίηση στο έδαφος βρίσκεται υπό μελέτη.

Αντιδράσεις Νιτρωδοποίησης

(1) $\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ Μονοξυγενάση της Αμμωνίας (AMO)

(2) $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ Οξυδοοξυγονοκτάση της Υδροξυλαμίνης (HAO)

Αντιδράσεις Νιτριοποίησης

(3) $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ Νιτρώδης οξυδοοξυγονοκτάση

Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί είναι χημειοαυτότροφοι και χρησιμοποιούν το CO_2 ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξή τους (Prosser., 2007). Και τα δύο στάδια της νιτροποίησης παράγουν ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται για την σύνθεση του ATP. Το πρώτο στάδιο της νιτρωδοποίησης, δηλαδή η οξείδωση της αμμωνίας προς υδροξυλαμίνη, έχει μελετηθεί περισσότερο γιατί θεωρείται πως είναι το ρυθμοκαθοριστικό στάδιο της νιτροποίησης αλλά και συνολικά του κύκλου του αζώτου.

Το ένζυμο-κλειδί στο βήμα αυτό είναι η μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO). Η AMO διασπά το O_2 και χρησιμοποιεί το ένα άτομο οξυγόνου για την οξείδωση της αμμωνίας ενώ το άλλο αντιδρά με το H^+ και σχηματίζει ένα μόριο ύδατος. Τα δύο ηλεκτρόνια που απαιτούνται προέρχονται από την οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη. Τα γονίδια *amoA* και *amoB* κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες του ενζύμου AMO ενώ ένα τρίτο γονίδιο *amoC* κωδικοποιεί μια βοηθητική μεμβρανική πρωτεΐνη (Moir et al., 1996; Hermann et al., 2000; Arp et al., 2002).

Η νιτροποίηση αποτελεί σημαντική διεργασία στα γεωργικά εδάφη και οικοσυστήματα όπου συνήθως χρησιμοποιούνται κυρίως αμμωνιακά λιπάσματα. Μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά, αυξάνει την έκπλυση του αζώτου καθώς τα νιτρικά ιόντα λόγω του αρνητικού τους φορτίου εκπλύνονται εύκολα προς τα υπόγεια νερά με αποτέλεσμα την εκτεταμένη νιτρορύπανση αγροτικών περιοχών.

1.3.1. Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB).

Τα AOB είναι χημειοαυτότροφοι μικροοργανισμοί (χρησιμοποιούν την οξείδωση της NH_3 για παραγωγή ενέργειας και το CO_2 ως πηγή C). Μερικά από αυτά έχουν περιορισμένη ετεροτροφική ικανότητα (μπορούν να προσλαμβάνουν και να αφομοιώνουν απλές οργανικές ενώσεις) (Arp et al., 2006), αν και σε όξινες συνθήκες δεν έχουν βρεθεί AOB που να χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις ως μοναδική πηγή ενέργειας.

Τα περισσότερα που είναι γνωστά για την φυσιολογία και βιοχημεία των AOB έχουν προέλθει από την μελέτη του βακτηρίου *Nitrosomonas europaea*. Το συγκεκριμένο βακτήριο πλεονεκτεί στο ότι αυξάνεται με σχετικά γρήγορους ρυθμούς και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας και νιτρωδών. Το στέλεχος *Nitrosomonas sp.* ENI-11 έχει παρόμοιες ιδιότητες με το *Nitrosomonas europaea* και έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες (Yamagata et al., 2000; Hirota et al., 2006).

Τα AOB έχουν σχετικά μικρό γονιδίωμα (μέσος όρος 3 MB) στο οποίο εντοπίστηκαν γονίδια για την βιοσύνθεση των απαραίτητων κυτταρικών συστατικών από ανόργανες θρεπτικές ενώσεις καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τέσσερις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την οξείδωση της αμμωνίας (AMO, HAO και κυτοχρώματα cSs4 (cyt cSJ) και cSs4 (cyt c,n552) (Arp et al., 2007). Το γονιδίωμα των AOB έδειξε έλλειψη γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για την αποδόμηση οργανικών ενώσεων καθώς και τα γονίδια (Arp et al., 2007).

Σε όξινες συνθήκες τα AOB παράγουν την ενέργεια που είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό τους όπως προαναφέρθηκε, από την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη (Εικόνα 5) Πρώτα χρησιμοποιούν το ένζυμο AMO, το οποίο προσδένεται στη μεμβράνη, για την μετατροπή της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH) και έπειτα στον περιπλασματικό χώρο χρησιμοποιούν το ένζυμο HAO για την μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη. Το πρώτο βήμα απαιτεί O_2 , δυο πρωτόνια και δυο ηλεκτρόνια. Το ένα οξυγόνο αντιδρά με την αμμωνία και σχηματίζεται η υδροξυλαμίνη και το άλλο ενώνεται με τα δυο πρωτόνια και τα δύο ηλεκτρόνια και παράγεται νερό (Wood, 1986, Hooper et al., 1997; Roughon et al., 2001). Στην οξείδωση της υδροξυλαμίνης σε νιτρώδη απελευθερώνονται τέσσερα ηλεκτρόνια τα οποία μεταφέρονται πρώτα μέσω του κυτοχρώματος C_{554} το οποίο βρίσκεται στο περίπλασμα και στη συνέχεια μέσω του κυτοχρώματος C_{m552} στη κυτταρική μεμβράνη. Στην συνέχεια τα δύο από τα τέσσερα ηλεκτρόνια συμμετέχουν στην περαιτέρω οξείδωση της αμμωνίας με το ένζυμο AMO και τα άλλα δύο χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του ATP (Shears et al., 1986, Arp et al., 2003; Hooper et al., 1997).

Η ταξινόμηση των AOB βασίζεται στις αλληλουχίες της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (16S rRNA γονιδιακού τύπου) και στην σύγκριση των γονιδιωμάτων. Τα AOB που απαντώνται στα εδαφικά οικοσυστήματα είναι μονοφυλετικά και ανήκουν όλα στα Beta-proteobacteria σε αντίθεση με τα AOB των υδάτων που ανήκουν τόσο στα Beta-proteobacteria και στα Gamma-proteobacteria. Ο Purkhold και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν το 2000 την πιο ενδελεχή φυλογενετική ανάλυση των AOB.

Τα AOB που ανήκουν στο γένος *Nitrosomonas* και απαντώνται στο έδαφος ανήκουν κυρίως στα συμπλέγματα (cluster) 2, 3 και 4 και σπανιότερα στα συμπλέγματα 6α και 7 (Kowalchuk et al., 2001; Prosser et al., 2002; Avrahami et al., 2005; Norton, 2008; Fierer et al., 2009). Από την άλλη μεριά τα βακτήρια του γένους *Nitrospira* εμφανίζουν ένα διαχωρισμό με βάση τον οικοφυσιολογικό τους ρόλο. Έτσι βακτήρια του γένους *Nitrospira* που ανήκουν στο σύμπλεγμα 2 εμφανίζεται κυρίως σε όξινα εδάφη (Nugroho et al., 2007) ενώ *Nitrospira* του συμπλέγματος 4 εμφανίζονται σε εδάφη που δεν έχουν υποστεί γεωργική επεξεργασία (Bruns et al., 1999).

Σε όλες τις Ηπείρους και τους ωκεανούς έχουν βρεθεί AOB. Δραστηριότητα των AOB έχει παρατηρηθεί σε θερμοκρασία κάτω του μηδενός αλλά και σε θερμόφιλα περιβάλλοντα (Miteva et al., 2007; Lebedeva et al., 2005) καθώς και σε όξινες και αλκαλικές συνθήκες (De Boer et al, 2001, Sorokin et al., 2001).

1.3.2. Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Η πρώτη ένδειξη ότι τα Αρχαία συμμετέχουν στην οξείδωση της αμμωνίας προήλθε από την μεταγονιδιωματική ανάλυση δειγμάτων από την θάλασσα των Σαρκασών που πραγματοποίησε ο Treusch και οι συνεργάτες του το 2005. Σύμφωνα με αυτή την μελέτη βρέθηκαν τα γονίδια *amoA* και *amoB* τα οποία κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες του ενζύμου AMO σε φοσμίδιο μαζί με το 16S rRNA γονίδιο ενός μεσόφιλου Κρεναρχαίου. Η απομόνωση του πρώτου AOA *Nitrosopumilus maritimus* επιβεβαίωσε την συμμετοχή των Αρχαίων στην οξείδωση της αμμωνίας. Το *Nitrosopumilus maritimus* απομονώθηκε από θαλάσσιο ενυδρείο και ταξινομήθηκε στα Κρεναρχαία (Könneke et al., 2005). Το συγκεκριμένο στέλεχος είχε την ικανότητα να οξειδώνει την αμμωνία απουσία οργανικού άνθρακα και χαρακτηρίστηκε ως χημειοαυτότροφο όπως τα AOB. Τα AOA ταξινομήθηκαν με βάση τις 16S rRNA αλληλουχίες τους στην ομάδα I των Κρεναρχαίων και στις ομάδες II και III των Ευρυαρχαίων.

Ο Leininger και οι συνεργάτες του το 2006 ύστερα από μελέτη 15 εδάφων από διαφορετικές κλιματικές ζώνες, επιβεβαίωσε την παρουσία και την αφθονία των AOA στο έδαφος. Επιπλέον παρατήρησε πως η "κυριαρχία" των AOA έναντι των AOB μεγάλωνε όσο αυξανόταν το βάθος του εδάφους. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το pH αποτελεί το κύριο και καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή ποιά από τις δύο ομάδες μικροοργανισμών, AOA ή AOB, θα κυριαρχήσει στο έδαφος. Έτσι φαίνεται ότι τα AOA αποτελούν τους κυρίαρχους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς σε όξινα εδάφη (He et al., 2007; Nicol et al., 2008; Hansel et al., 2008). Ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά στον πληθυσμό των AOA είναι η θερμοκρασία. Συγκεκριμένα έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην δράση και στον πληθυσμό των AOA σε θερμοκρασία 30°C (Tourna et al., 2008) χωρίς να σχετίζεται η ανάπτυξη των AOB οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα AOA ίσως είναι οι κυριότεροι αμμωνία- οξειδωτικοί μικροοργανισμοί στο χώμα πάνω υπό συγκεκριμένο όριο θερμοκρασίας.

1.4 Επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς

Τα γεωργικά φάρμακα είναι ενώσεις που ταξινομούνται με βάση τον οργανισμό που στοχεύουν (ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα). Η μοριακή πολυπλοκότητά τους είναι τεράστια. Το 1995 στην Ευρωπαϊκή Ένωση χρησιμοποιήθηκαν περισσότερες από 700 διαφορετικές δραστικές ενώσεις (Heinz et al 1995). Υπάρχουν γεωργικά φάρμακα με παρόμοια χημική δομή που δρουν κατά του ίδιου βιολογικού συστήματος αλλά συμπεριφέρονται διαφορετικά στο έδαφος. Ο τρόπος δράσης τους διαφέρει. Σε γενικές γραμμές τα γεωργικά φάρμακα παρασκευάζονται για να επιδρούν είτε σε εξειδικευμένες είτε σε γενικές διεργασίες του οργανισμού στόχου. Για να εγκριθεί η

κυκλοφορία ενός γεωργικού φαρμάκου είναι απαραίτητος ο έλεγχος των επιδράσεων του στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η συσχέτιση της χημικής δομής του γεωργικού φαρμάκου με την επίδρασή του σε διάφορες ομάδες μικροοργανισμών δεν είναι εύκολη.

Ορισμένα γεωργικά φάρμακα ενισχύουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ενώ άλλα δεν επηρεάζουν την μικροπανίδα όταν εφαρμόζονται σε φυσιολογική δόση. Για παράδειγμα το carbofuran ενισχύει τον πληθυσμό του *Azospirillum* και των αναερόβιων μικροοργανισμών που συμμετέχουν στο σχηματισμό του αζώτου στο έδαφος ενώ το butachlor μειώνει τον πληθυσμό τους (Jena et al., 1986, Chen et al., 2009). Τα ζιζανιοκτόνα που περιέχουν φώσφορο και το εντομοκτόνο methamidophos αυξάνουν την μικροβιακή ανάπτυξη στο έδαφος αλλά το εντομοκτόνο fenamiphos το οποίο και αυτό περιέχει φώσφορο είναι επιβλαβές για τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Caceres et al., 2009, Li, X et al., 2008). Ο Wang et al., 2004 μελέτησε την επίδραση του iprodione στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και διαπίστωσε πως σε υψηλές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αυξάνεται με γρήγορους ρυθμούς.

Οι νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί εμφανίζουν ευαισθησία σε εξωγενής καταπονήσεις όπως είναι και η έκθεση σε γεωργικά φάρμακα. Παρόλα αυτά οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς είναι ελάχιστες. Η Hernandez et al, (2011) μελέτησαν την επίδραση του γεωργικού φαρμάκου simazine στα νιτροδοποιητικά βακτήρια και αρχαία με την μέθοδο μοριακής απότύπωσης DDGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας το γεωργικό φάρμακο δεν επιδρά μόνο στο μικρόβιο στόχο αλλά αναστέλει την οξείδωση της αμμωνίας και την δραστηριότητα των νιτροδοποιητικών βακτηρίων ενώ δεν επιδρά στα νιτροδοποιητικά αρχαία. Η μελέτη της εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων cyprodynil και penconazole στο έδειξε έδειξε πως τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα προκαλούν σημαντικές αλλά παροδικές αλλαγές στην αφθονία, στην ποικιλομορφία και στη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (Puglisi et al., 2012). Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης έρευνας τα γεωργικά φάρμακα oxamyl, fluensulfone και QLAGri δεν επιδρούν στα νιτροδοποιητικά αρχαία και βακτήρια ενώ το BIOACT, ένα βιολογικό σκεύασμα, επέφερε σημαντικές αλλά παροδικές μεταβολές στην αφθονία, λειτουργία και ποικιλότητα των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (Rousidou et al., 2013).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ευαισθησία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στα γεωργικά φάρμακα και οι αρνητικές

επιπτώσεις που μπορεί να έχει η αναστολή της λειτουργίας των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στον κύκλο του N και γενικότερα στην λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος μας ώθησε να μελετήσουμε την επίδραση του μυκητοκτόνου iprodione, αλλά και των προϊόντων μεταβολισμού του (κυρίως της 3,5-DCA) στην αφθονία και λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα μελετήσαμε την υπόθεση ότι η προσθήκη στο έδαφος πριν την εφαρμογή του μυκητοκτόνου αμμωνιακής λίπανσης θα οδηγούσε σε αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα τα AOA και AOB με αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση πιθανών αρνητικών επιδράσεων από την έκθεση στο μυκητοκτόνο iprodione.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Έδαφος

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος συλλέχθηκε από αγροτεμάχιο του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικών Ερευνών (ΕΘΙΑΓΕ) στην περιοχή της Λάρισας. Ο συγκεκριμένος αγρός δεν είχε ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων για περισσότερο από 10 έτη. Μετά την δειγματοληψία, το έδαφος κοσκινίστηκε με κόσκινο μεγέθους 3 mm για να απομακρυνθούν οι ξένες ύλες και έγινε προσδιορισμός των βασικότερων φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών.

Για την μέτρηση του pH (8,3) ζυγίστηκαν σε κωνική φιάλη 5 gr εδάφους, τα οποία είχαν προηγουμένως αεροξηρανθεί, και προστέθηκαν 10 ml νερού, ακολούθησε ανάδευση για 15 min και το pH προσδιορίστηκε σε πεχάμετρο.

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας ζυγίστηκαν 5 g εδάφους και τοποθετήθηκαν στους 105°C για 24 h. Στην συνέχεια και αφού αφέθηκαν να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η υγρασία ως η επί τοις εκατό απώλεια μάζας του εδάφους.

3.2. Iprodione και μεταβολίτες

Για την ανάλυση των υπολειμμάτων του iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού του 3,5-DCA στο έδαφος χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα υψηλής καθαρότητας (99%, Fluka). Με την χρήση των αναλυτικών προτύπων προετοιμάστηκαν διαλύματα των iprodione και 3,5-DCA σε μεθανόλη (1000 µg/ml) και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή με διαδοχικές αραιώσεις σειράς πρότυπων διαλυμάτων των iprodione και 3,5-DCA που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων τους στα δείγματα εδάφους. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την χρωματογραφική ανάλυση και την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων ήταν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, νερό HPLC grade (Merck GmbH, Germany) και φωσφορικό οξύ pA grade (AppleChem).

Για την εφαρμογή του iprodione στο έδαφος παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα του μυκητοκτόνου χρησιμοποιώντας το εμπορικό σκεύασμα ROVRAL® 50% (το οποίο μας παραχωρήθηκε από την εταιρεία BASF HELLAS). Έτσι με διαδοχικές αραιώσεις σε νερό προετοιμάστηκαν υδατικά διαλύματα iprodione συγκεντρώσεων 6000, 600 και 60 µg/ml τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του iprodione στο έδαφος.

3.3. Προετοιμασία πειράματος μικροκόσμων

Το κοσκινισμένο έδαφος (8 kg) χωρίστηκε σε δύο μέρη (4 kg το καθένα). Στο ένα μόνο μέρος προστέθηκαν 10 ml υδατικού διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M (τελική δόση στο έδαφος 154 mg-N/kg εδάφους), ενώ στο άλλο μέρος δεν έγινε προσθήκη διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ παρά μόνο νερού. Και τα δύο μέρη εδάφους χωρίστηκαν στην συνέχεια σε τέσσερα επιμέρους δείγματα (963 g το καθένα). Στο τρία πρώτα σετ δειγμάτων πραγματοποιήθηκε εφαρμογή iprodione σε δόσεις x1, x10 και x100 της μέγιστης συνιστώμενης. Το τελευταίο σετ δειγμάτων δέχτηκε την ίδια ποσότητα νερού χωρίς iprodione και αποτέλεσε το δείγματα MARTYPA (x0). Τα δείγματα αναμίχθηκαν επιμελώς με το χέρι και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσαρμογή της υγρασίας στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Αμέσως μετά τα 8 δείγματα διαχωρίστηκαν σε υπο-δείγματα των 50 g και τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 27°C. Αμέσως μετά την εφαρμογή του iprodione (0 ημέρες) και 7, 14, 21, 35 και 56 ημέρες αργότερα τρία δείγματα από κάθε μια από τις οκτώ μεταχειρίσεις απομακρύνονταν από τον επωαστικό θάλαμο και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αποδόμησης του iprodione και τον σχηματισμό του 3,5-DCA αλλά και για εκχύλιση DNA και προσδιορισμό της αφθονίας του *amoA* γονιδίου των AOA και AOB με q-PCR. Με βάση το παραπάνω πειραματικό πλάνο μελετήθηκαν οι παρακάτω οκτώ μεταχειρίσεις:

- x0N, x1N, x10N, x100N

- x0, x1, x10, x100

3.4. Προσδιορισμός επιπέδων NH_3 , NO_2^- και NO_3^- στο έδαφος

3.4.1. Εκχύλιση NH_3 , NO_2^- και NO_3^- στο έδαφος.

Αρχικά ζυγίστηκαν 2 g εδάφους και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες falcon των 50 ml. Προστέθηκαν 20 ml διαλύματος KCL 1M και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε περιστροφικό αναδευτήρα. Τέλος διηθήθηκαν μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman μεγέθους 8,5 cm και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των συγκεντρώσεων NO_2^- , NO_3^- και NH_3 όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.4.2. Προσδιορισμός NO_2^- και NO_3^- .

Για τον προσδιορισμό των νιτρικών και νιτρώδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χλωριούχου βαναδίου (VCL_3) των Waner et al., (2009). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή τα νιτρώδη (NO_2) οξειδώνονται σε νιτρικά (NO_3) με την προσθήκη VCL_3 . Στην συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Griess και υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους φωτομετρικά στα 450 nm με την χρήση εξωτερικής πρότυπης καμπύλης. Για την κατασκευή της τελευταίας προετοιμάστηκαν πρότυπα διαλύματα NO_3^- συγκεντρώσεων από 0.02 ως 5 mg N- $\text{NO}_3 \text{ L}^{-1}$ με διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος $\text{KNO}_3 \text{ } 1000 \text{ mg N L}^{-1}$. Σε μικροπηγάδια τιτλοδότησης προστέθηκαν 100 μl από κάθε δείγμα - εκχύλισμα, 100 μl χλωριούχου βαναδίου (VCL_3) και 50 μl από τα αντιδραστήρια Griess 1 και 2. Έπειτα τοποθετήθηκαν τα μικροπηγάδια τιτλοδότησης στους 37°C για μισή ώρα και πραγματοποιήθηκε μέτρηση σε φωτόμετρο στα 540 nm.

3.4.3. Προσδιορισμός NH_3 .

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αμμωνίας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Kandeler et al., (1988). Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στο πράσινο χρώμα που παράγεται μετά την οξείδωση της αμμωνίας από το μετά νατρίου διχλωροισοκυανικό οξύ, παρουσία φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον.

Έτσι αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,0195 ως 5 mg N L^{-1} για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης, από διάλυμα KCL 1M. Σε μικροπηγάδια τιτλοδότησης προστέθηκαν 700 μl από τα πρότυπα διαλύματα και από τα δείγματα – εκχυλίσματα. Επιπλέον, προστέθηκαν 350 μl διαλύματος χρώσης και 140 μl διαλύματος οξείδωσης. Τέλος τα μικροπηγάδια τιτλοδότησης τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα για 45 λεπτά στα 300 rpm και πραγματοποιήθηκε μέτρηση σε φωτόμετρο στα 660 nm.

3.5. Προσδιορισμός υπολειμμάτων iprodione και προϊόντων μεταβολισμού του στο έδαφος

3.5.1. Εκχύλιση Iprodione και προϊόντων μεταβολισμού από το έδαφος

Για την εκχύλιση του iprodione και των προϊόντων μεταβολισμού του στο έδαφος ζυγίστηκαν σε κωνική φιάλη 5 g εδάφους και προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση στα 200 rpm για 1h και στην συνέχεια φυγοκέντρωση στα 7500 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο παραλήφθηκε και ακολούθησε διήθηση διαμέσου φίλτρου σύριγγας και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυση του σε σύστημα HPLC Shimadzu Nexera XR με ανιχνευτή φωτοδιόδων (HPLC-PDA) που ήταν εφοδιασμένο με στήλη αντίστροφης φάσης C18

3.5.2. Μέθοδος ανάλυσης iprodione και προϊόντων μεταβολισμού

Τα υπολείμματα του iprodione και του κύριου μεταβολίτη του 3,5 – DCA διαχωρίστηκαν με κινητή φάση ακετονιτρίλιο (70%) + νερό (30%) (κατ.ογκο). Ο χρόνος κατακράτησης του iprodione ήταν 4,8 min ενώ του μεταβολίτη ήταν 3,8 min.

3.5.3. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του iprodione και των μεταβολιτών του πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό από τα πρότυπα διαλύματα των iprodione και 3,5-DCA (1000 µg/mL) σε μεθανόλη παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.02 και 0.01 µg/mL σε μεθανόλη με διαδοχικές αραιώσεις και έγινε έγχυση 20 µl από καθένα από τα πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου και των μεταβολιτών του ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

3.6. Μοριακές αναλύσεις

3.6.1. Εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους (0.5 g)

Πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθως το DNA ποσοτικοποιήθηκε με την χρήση φθορισμομέτρου Qubit® 2.0.

3.6.2. Προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των AOA και AOB σε δείγματα εδάφους με την χρήση PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR)

Για το προσδιορισμό της αφθονίας των AOA και AOB χρησιμοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των δύο αυτών ομάδων νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB και AOA χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές *amoA1F* - *amo 2R* (Rotthauwe et al., 1997) και *Crenamo23F* (0,4 µM) - *Crenamo 616 R* (0,4 µM) αντίστοιχα (Tourna 2007). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις ενίσχυσης του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 ενώ οι συνθήκες πραγματοποίησης της PCR πραγματικού χρόνου για τα AOA και AOB παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4 αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA και AOB.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1X
Forward primer (20pmol/μl) AOB: AmoA1F AOA: Crenamo23F	0,2 μl	0.4 μM
Reverse primer (20pmol/μl) AOB: AmoA2R AOA: Crenamo616R	0,2 μl	0.4 μM
BSA (10μg/μl)	0,1 μl	200 ng/μl
DNA	0,2 μl	2,5 ng/μl
ddH ₂ O	2,5 μl	
Συνολικός όγκος	10 μl	

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με ενίσχυση του γονιδίου-στόχου από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι Ct τιμές κάθε συγκέντρωσης. Η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων στηρίχθηκε στις τιμές Ct της καμπύλης αναφοράς. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Τη φάση ενίσχυσης ακολουθεί η φάση αποδιάταξης, όπου γίνεται κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης. Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Mx3000P QPCR (Stratagen).

Πίνακας 3. Συνθήκες PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση του γονιδίου amoA των AOA

Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	10 sec	45 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C	15 sec	
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C	1 min	1 κύκλος
	65°C	30 sec	
	95°C	30 sec	

Πίνακας 4. Συνθήκες PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB

Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	3 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5 sec	45 κύκλους
Υβριδοποίηση	57 °C	10 sec	
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	95°C	1 min	1 κύκλος
	65°C	30 sec	
	95°C	30 sec	

3.7. Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων

Για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής (DT50) του iprodione στις διάφορες μεταχειρίσεις χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα κινητικής που έχουν προταθεί από την ομάδα εργασίας FOCUS (FOCUS 2006). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των DT₅₀ χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single first order, SFO) και δύο μη γραμμικά μοντέλα κινητικής (Hockey Stick, και Bi-exponential) (Πίνακας 5). Το στατιστικό πρόγραμμα R χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής και το σχεδιασμό των διαγραμμάτων. Γενικότερα, τα διφασικά μοντέλα κινητικής χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις στις οποίες το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Τα δεδομένα των πειραμάτων αναλύθηκαν με Ανάλυση Παραλλακτικότητας δύο παραγόντων (Two-Way ANOVA). Οι δύο παράγοντες που αξιολογήθηκαν ως προς την επίδραση τους στην διακύμανση των τιμών ήταν: ο χρόνος και η δόση του iprodione καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους με προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης ή χωρίς.

Πίνακας 5: Οι μαθηματικές εξισώσεις των μοντέλων κινητικής για τη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων και οι εξισώσεις υπολογισμού του χρόνου ημιζωής τους.

Μοντέλο	Μαθηματική εξίσωση	Υπολογισμός Χρόνου Ημιζωής
Single first order (linear) (SFO)	$C = C_0 e^{-kt}$	$t_{1/2} = \ln 2 / K$

Hockey Stick (HS)	$C = C_0 e^{-K_1 t}$ for $t \leq t_b$	$t_{1/2} = \ln 2 / K_1$
	$C = C_0 e^{-k_1 t} e^{-k_2 (t - t_b)}$ for $t > t_b$	$t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - k_1 t_b) / k_2$
Bi-exponential (DFOP)	$C = C_0 (g e^{-k_1 t} + (1 - g) e^{-k_2 t})$	Iterative method

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

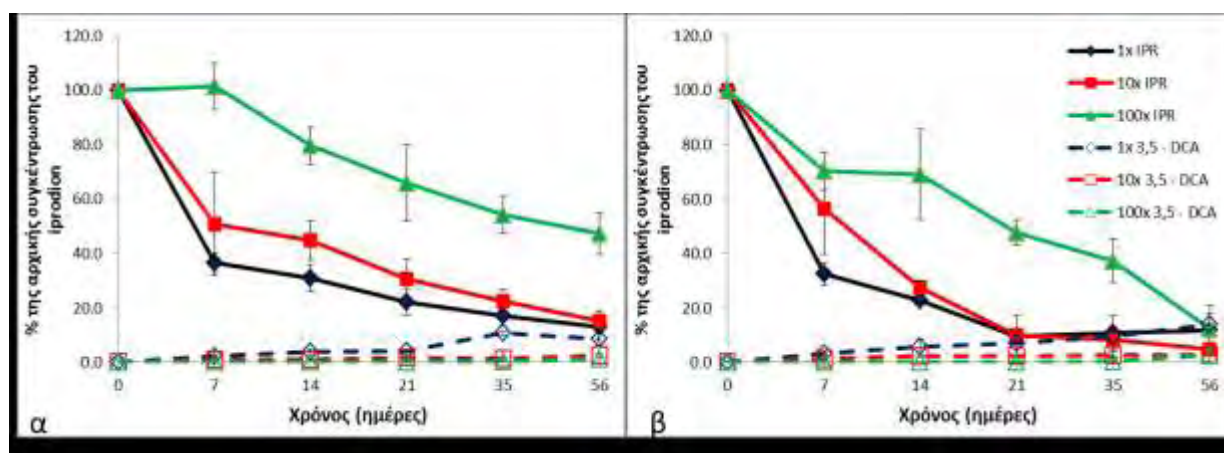
4.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός του iprodione στο έδαφος

Η αποδόμηση του iprodione περιγράφηκε αποτελεσματικά με: ^(a) το μοντέλο SFO και ^(b) το μοντέλο HS σύμφωνα με τα οποία υπολογίστηκαν και οι τιμές DT_{50} για το iprodione σε όλα τα εδάφη (Πίνακας 6). Ανεξάρτητα από την προσθήκη ή όχι αμμωνιακής λίπανσης παρατηρήθηκε μια επιβράδυνση της αποδόμησης του iprodione όταν αυτό εφαρμόστηκε σε επίπεδα $\times 100$ της συνιστώμενης ($DT_{50} = 42,5$ και $22,1$ ημέρες στα εδάφη με ή χωρίς N λίπανση αντίστοιχα), σε σύγκριση με τις τιμές DT_{50} του iprodione στα αντίστοιχα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή $\times 1$ ($DT_{50} = 0,35$ και $4,35$ ημέρες στα εδάφη με ή χωρίς N λίπανση αντίστοιχα) και $\times 10$ ($DT_{50} = 13,6$ και $7,61$ ημέρες στα εδάφη με ή χωρίς N λίπανση αντίστοιχα) της συνιστώμενης. Η προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης πριν την εφαρμογή του iprodione φαίνεται να προκαλέσει μια σχετική επιβράδυνση της αποδόμησης του iprodione στις δόσεις $\times 10$ και $\times 100$ της συνιστώμενης.

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται το πρότυπο αποδόμησης του iprodione και ο σχηματισμός του μεταβολίτη 3,5 DCA. Η αποδόμηση του iprodione σε όλες τις μεταχειρίσεις συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό 3,5-DCA του οποίου οι συγκεντρώσεις στο έδαφος αυξήθηκαν με την πάροδο του χρόνου και δεν εμφάνισε τάση αποδόμησης στο έδαφος. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις 3,5-DCA όπως και αναμενόταν καταγράφηκαν με την ολοκλήρωση της επώασης στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή της δόσης $\times 100$ της συνιστώμενης με τα δείγματα που δεν είχαν δεχτεί αμμωνιακή λίπανση να εμφανίζουν και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ($3,10 \text{ mg/kg}$ vs $1,65 \text{ mg/kg}$ στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή αμμωνιακών). Θα πρέπει να τονιστεί ότι εκτός του 3,5-DCA δεν ανιχνεύθηκαν άλλοι μεταβολίτες.

Πίνακας 5: Οι κινητικές διάσπασης του iprodion με ή χωρίς προσθήκη αζώτου.

	Μεταχείριση	k (d ⁻¹)	k1 (d ⁻¹)	k2 (d ⁻¹)	tb	k _m (d ⁻¹)	ff	DT ₅₀ (d)	χ ² (%)
Χωρίς N	IPR 1x ^b		0.159	0.017	10.4			4.35	11.3
	IPR 10x ^a	0.091						7.61	8.0
	IPR 100x ^a	0.031						22.1	7.3
Με N	IPR 1x ^b		0.196	0.025	0.43			0.35	4.7
	IPR 10x ^a	0.051						13.6	14.7
	IPR 100x ^a	0.016						42.5	6.3

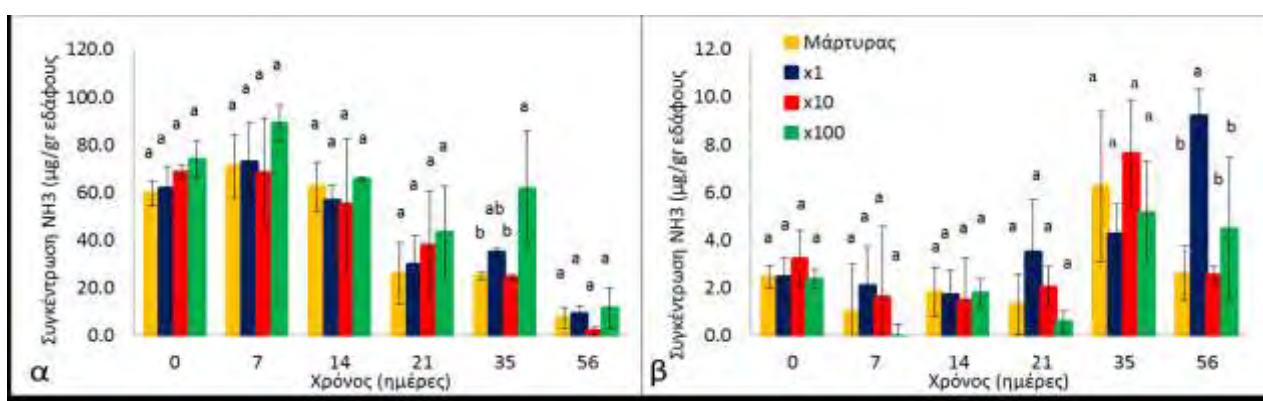


Διάγραμμα 1. Η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός του κύριου μεταβολικού προϊόντος

του 3,5-DCA στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή x1, x10 ή x100 της συνιστώμενης δόσης iprodione. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ξεχωριστά για τα εδάφη τα οποία είχαν δεχτεί πριν την εφαρμογή iprodione προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης (α) ή δεν είχαν δεχτεί προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης (β). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τη τυπική απόκλιση.

4.2. Η επίδραση του iprodione στις συγκεντρώσεις αμμωνιακών στο έδαφος

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η χρονική διακύμανση της συγκέντρωσης αμμωνίας υπό την επίδραση διαφορετικών δόσεων iprodione σε δείγματα στα οποία έγινε προσθήκη αμμωνιακών ιόντων ((NH₄)₂SO₄) (α) και αντίστοιχα σε δείγματα εδάφους όπου δεν έγινε προσθήκη αμμωνιακών (β). Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στην περίπτωση όπου δεν έγινε προσθήκη αμμωνιακών, υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της αμμωνίας ως προς τις δόσεις ($p < 0.05$), τον χρόνο ($p < 0.05$) αλλά και ως προς την αλληλεπίδραση του χρόνου με τις δόσεις ($p < 0.05$). Στην περίπτωση όπου έγινε προσθήκη αμμωνιακών, υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της αμμωνίας ως προς τις δόσεις ($p < 0.05$) και τον χρόνο ($p < 0.05$) αλλά όχι ως προς την αλληλεπίδραση του χρόνου με τις δόσεις ($p > 0.05$). Παρόλαυτα δεν παρατηρήθηκε κάποιο ξεκάθαρο χρονοεξαρτώμενο πρότυπο διακύμανσης των τιμών ως προς κάποια μεταχείρισης και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν και ήταν στατιστικά σημαντικές δεν εμφάνισαν κάποιο δοσοεξαρτώμενο πρότυπο (πχ. T35 ημέρες Διάγραμμα 2α ή T56 ημέρες Διάγραμμα 2β).

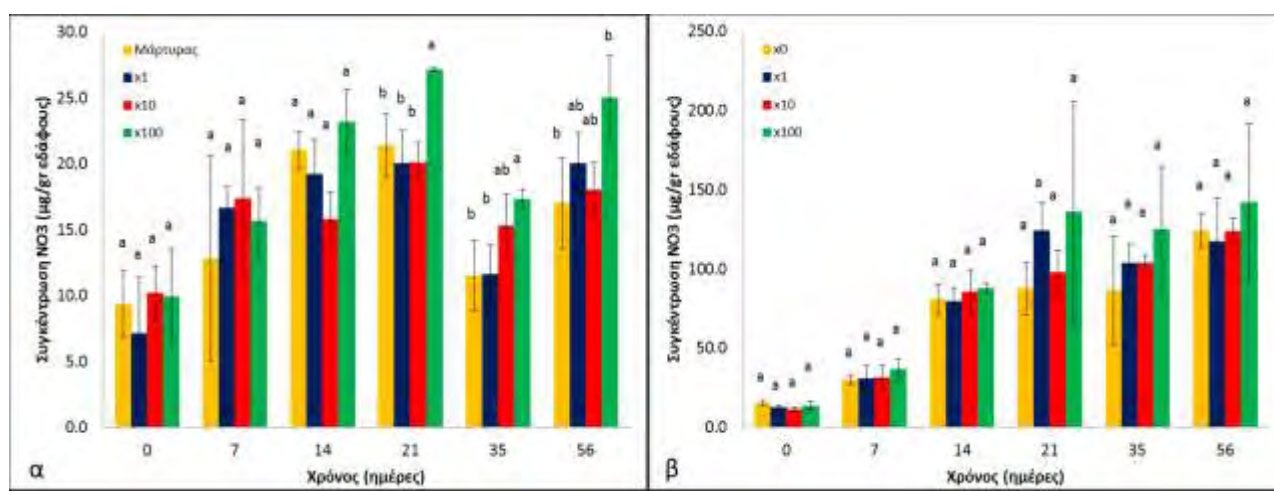


Διάγραμμα 2. Το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των αμμωνιακών στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών δόσεων iprodione (x0, x1, x10, x100 της συνιστώμενης) και στα οποία είχε προηγηθεί εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης (α) ή όχι (β). Κάθε τιμή είναι ο μέσος

όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα διαφέρουν σημαντικά (επίπεδο σημαντικότητας 5%)

4.3. Η επίδραση του iprodione στις συγκεντρώσεις νιτρικών στο έδαφος

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η χρονική διακύμανση της συγκέντρωσης νιτρικών υπό την επίδραση διαφορετικών δόσεων iprodione σε δείγματα στα οποία έγινε προσθήκη αμμωνιακών ιόντων ((NH₄)₂SO₄) (α) και αντίστοιχα σε δείγματα εδάφους όπου δεν έγινε προσθήκη αμμωνιακών (β). Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στην περίπτωση όπου δεν έγινε προσθήκη αμμωνιακών, υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των νιτρικών ως προς τις δόσεις ($p < 0.05$), τον χρόνο ($p < 0.05$) αλλά όχι ως προς την αλληλεπίδραση του χρόνου με τις δόσεις ($p > 0.05$). Στην περίπτωση όπου έγινε προσθήκη αμμωνιακών, υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των νιτρικών ως προς τον χρόνο ($p < 0.05$) αλλά όχι ως προς τις δόσεις ($p > 0.05$) και την αλληλεπίδραση του χρόνου με τις δόσεις ($p > 0.05$).

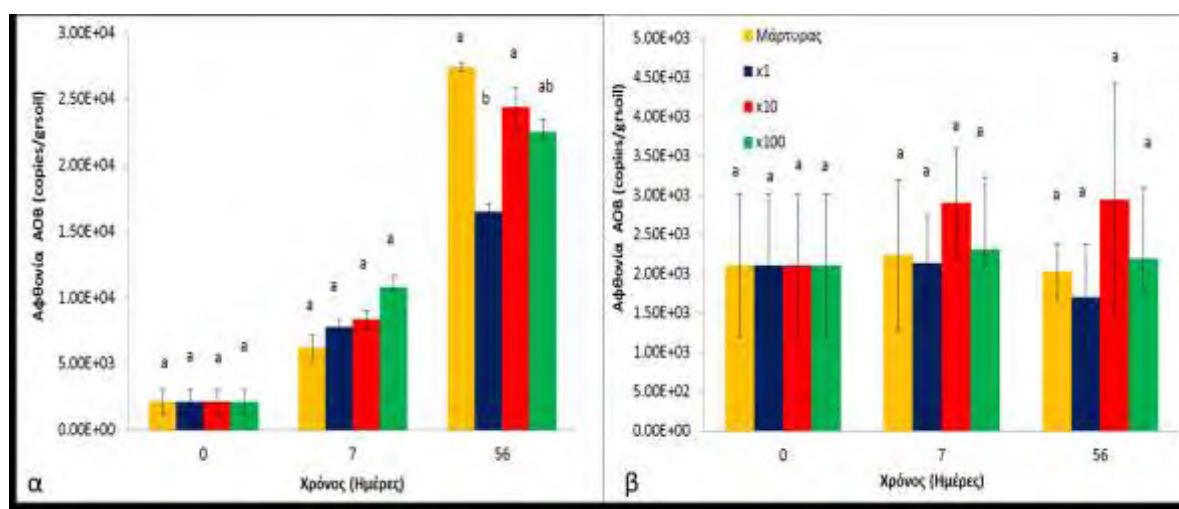


Διάγραμμα 3. Το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των νιτρικών στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών δόσεων iprodione (x0, x1, x10, x100 της συνιστώμενης) και στα οποία είχε προηγηθεί εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης (α) ή όχι (β). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα διαφέρουν σημαντικά (επίπεδο σημαντικότητας 5%)

Γενικότερα παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης νιτρικών σε όλες τις μεταχειρίσεις (ανεξαρτήτου δόσης του iprodione) ειδικότερα σε αυτές που είχαν δεχτεί αμμωνιακή λίπανση. Εκτός αυτού οι συγκεντρώσεις νιτρικών δεν ακολούθησαν κάποιο δοσοεξαρτώμενο πρότυπο.

4.4. Η επίδραση του iprodione στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών στο έδαφος

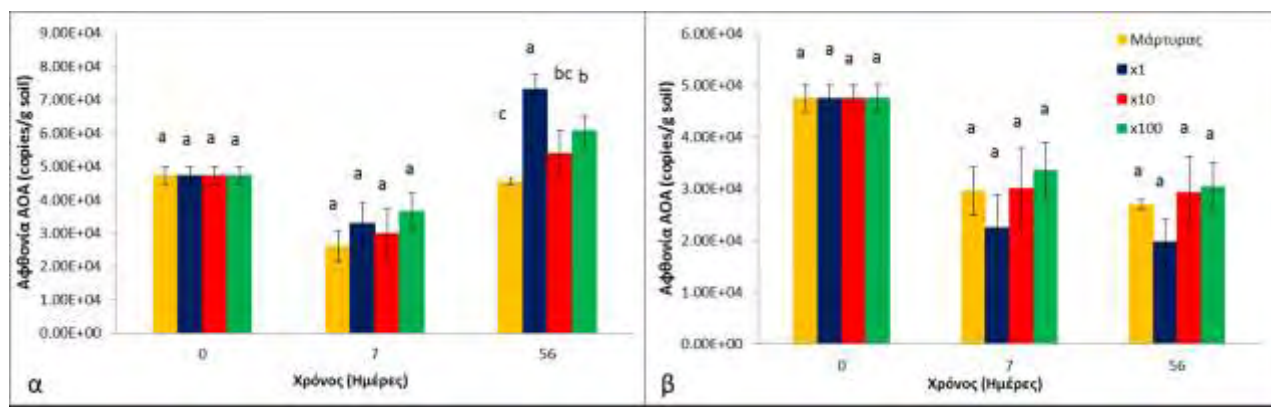
Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού της αφθονίας των AOB στα εδάφη που δέχτηκαν διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων iprodione και στα οποία είχε (α) ή δεν είχε προηγηθεί προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (β). Στα δείγματα που δεν δέχτηκαν αρχικά εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης, η αφθονία των βακτηρίων AOB δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διακύμανση καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ως προς κανέναν παράγοντα ($p>0.05$) (Διάγραμμα 4β). Αντιθέτως, στα δείγματα που δέχθηκαν αμμωνιακή λίπανση (Διάγραμμα 4α), παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αφθονία των AOB ως προς το χρόνο ($p<0.05$), τις δόσεις ($p<0.05$) και ως προς την αλληλεπίδραση του χρόνου με τις δόσεις ($p<0.05$). Ειδικότερα παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αφθονίας των AOB με το χρόνο σε όλες τις μεταχειρίσεις ανεξαρτήτου δόσης εφαρμογής iprodione. Από την άλλη μεριά δεν παρατηρήθηκε κάποιο ξεκάθαρο πρότυπο δοσοεξαρτώμενης μεταβολής της αφθονίας των AOB στο χρόνο.



Διάγραμμα 4. Η αφθονία των AOB (αντίγραφα γονιδίου *amoA*/g εδάφους) στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή iprodione σε επίπεδα x0, x1, x10, x100 της συνιστώμενης δόσης και στα οποία είχε εφαρμοστεί (α) ή όχι (β) αμμωνιακή λίπανση. Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται το πρότυπο μεταβολών της αφθονίας των AOA σε σχέση με το χρόνο στις διάφορες μεταχειρίσεις iprodione στην περίπτωση (α) μη προσθήκης αμμωνιακών ιόντων ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) και (β) προσθήκης αμμωνιακών ιόντων. Στα δείγματα που δεν δέχτηκαν αρχικά εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην

αφθονία των ΑΟΑ ως προς το χρόνο ($p<0.05$) (Διάγραμμα 5β). Στα δείγματα που δέχθηκαν περίσσεια αμμωνιακής λίπανσης, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αφθονία των ΑΟΑ ως προς το χρόνο ($p<0.05$), τις δόσεις ($p<0.05$) και ως προς την αλληλεπίδραση του χρόνου με τις δόσεις ($p<0.05$) (Διάγραμμα 5α). Παρά τις στατιστικά σημαντικές επιδράσεις των δύο παραγόντων που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε και εδώ κάποια ξεκάθαρη δοσοεξαρτώμενη μεταβολή της αφθονίας των ΑΟΑ στο χρόνο.



Διάγραμμα 5. Η αφθονία των ΑΟΑ (αντίγραφα γονιδίου *amoA*/g εδάφους) στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή iprodione σε επίπεδα x0, x1, x10, x100 της συνιστώμενης δόσης και στα οποία είχε εφαρμοστεί (α) ή όχι (β) αμμωνιακή λίπανση. Κάθε ράβδος είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + τυπική απόκλιση. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ράβδοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκε η επίδραση του μυκητοκτόνου iprodione στην λειτουργία και αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Οι τελευταίοι επιλέχθηκαν καθώς θεωρούνται ως ιδανικοί βιοδείκτες τοξικότητας αβιοτικών καταπονήσεων και δη γεωργικών φαρμάκων στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Wessen and Hallin 2011; Pereira e Silva et al. 2013). Από την άλλη μεριά η επιλογή του iprodione βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες που

έδειξαν ότι η εφαρμογή του στο έδαφος οδήγησε σε δραματική μείωση της δυνητικής νιτροποίησης αλλά και της δραστηριότητας άλλων μικροβιακών ενζύμων στο έδαφος. Η ανασταλτική αυτή δράση αποδόθηκε ύστερα από στατιστική ανάλυση στον σχηματισμό και συσώρευση στο έδαφος του κύριου μεταβολικού προϊόντος του iprodione, το 3,5-DCA (Pappola et al. 2014). Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης επιλέξαμε να μελετήσουμε την επίδραση του iprodione και του 3,5-DCA σε ένα διαφορετικό έδαφος αλλά αυτή την φορά ύστερα από προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης. Η υπόθεση μας ήταν ότι πιθανή ανασχετική δράση του iprodione και του 3,5-DCA στη δράση και λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών θα μεγιστοποιηθεί ύστερα από προσθήκη φρέσκου αζωτούχου υποστρώματος για τα AOB και AOA που όντας σε φάση αύξησης και ανάπτυξης θα είναι πιο ευάλωτα στην επίδραση του γεωργικού φαρμάκου ή του 3,5-DCA.

Από τις αρχικές μας μετρήσεις (πριν την εφαρμογή αμμωνιακής λίπανσης και του μυκητοκτόνου) προέκυψε μια κυριαρχία των AOA σε σχέση με τα AOB στο έδαφος που μελετήθηκε. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι σε αρκετά εδάφη τα AOA εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη αφθονία σε σχέση με τα AOB (Leininger et al., 2006; He et al., 2007; Nicol et al., 2008) χωρίς όμως αυτό να αποτελεί ασφαλή δείκτη του σημαντικότερου ρόλου τους στην διεργασία της νιτροποίησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης, ανεξάρτητα από την προσθήκη ή όχι του μυκητοκτόνου iprodione, οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ρυθμού της νιτροποίησης όπως φαίνεται από την σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών στα συγκεκριμένα εδάφη και την αντίστοιχη μείωση των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών. Το συγκεκριμένο πρότυπο διακύμανσης των συγκεντρώσεων αμμωνιακών και νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν αμμωνιακή λίπανση δείχνει ότι η διαδικασία της νιτροποίησης είναι απολύτως λειτουργική και οι νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί μπορούν αποτελεσματικά να μετατρέψουν την προστιθέμενη περίσσεια αμμωνίας σε νιτρικά. Παρόμοιες μελέτες των Malhi και McGill, (1981), απέδειξαν ότι η προσθήκη περίσσειας αμμωνιακών ιόντων (συγκέντρωσης έως και 200 $\mu\text{g/g}$ εδάφους) οδήγησε σε αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών στο έδαφος. Εντούτοις, οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι η προσθήκη περίσσειας αμμωνιακών ιόντων (συγκεντρώσεως > 200 $\mu\text{g/g}$ εδάφους), οδήγησε σε παρεμπόδιση της νιτροποίησης.

Η προσθήκη αμμωνιακής λίπανσης στο έδαφος ανεξάρτητα από την προσθήκη ή όχι iprodione οδήγησε σε σημαντική αύξηση της αφθονίας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους που ήταν περισσότερο εμφανής για τα AOB των οποίων η αφθονία έφθασε σε επίπεδα ανάλογα αυτών των AOA με την ολοκλήρωση του πειράματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη ότι τα AOB, παρά την χαμηλότερη αρχική αφθονία τους, έχουν πιο σημαντικό ρόλο

στην νιτρωδοποίηση σε σχέση με τα AOA στο συγκεκριμένο έδαφος. Τα αποτελέσματα μας βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι η προσθήκη ανόργανης αμμωνιακής λίπανσης οδηγεί σε αύξηση της αφθονίας των AOB τα οποία σε αυτές τις περιπτώσεις κατέληξαν να κυριαρχούν στο έδαφος έναντι των AOA (Di et al. 2009; Jia & Conrad 2009). Η αρνητική επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης αμμωνίας στην αφθονία των AOA έχει αποδοθεί στην γενικά στην ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια των AOA με την NH_3 ως υπόστρωμα σε σχέση με τα AOB που οδηγεί σε ανάσχεση της ανάπτυξης τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνιακού αζώτου (Hatzenpichler 2012).

Ο βασικότερος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσει την επίδραση του iprodione και του μεταβολίτη του 3,5-DCA στην αφθονία και λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Παράλληλα μελετήθηκε και η αποδόμηση του iprodione και ο σχηματισμός του 3,5-DCA στα διάφορα επίπεδα εφαρμογής ώστε να εντοπιστούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ του επιπέδου έκθεσης της μικροβιακής κοινότητας στις παραπάνω ουσίες και της εμφάνισης επιπτώσεων στην λειτουργία και αφθονία των AOA και AOB. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι αύξηση της δόσης εφαρμογής του iprodione σε επίπεδο $\times 100$ της συνιστώμενης οδήγησε σε σημαντική επιβράδυνση της αποδόμησης του στο έδαφος. Παρόμοιες μελέτες από τους Papadopoulou et al. (2016) έδειξαν μια ανάλογη δοσοεξαρτώμενη αύξηση της εμμονής των isoproturon και tebuconazole στο έδαφος η οποία συνήθως αποδίδεται στην αδυναμία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους να αποδομήσει τις υψηλές συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στις οποίες εκτίθεται. Η αποδόμηση του iprodione συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό και την συσσώρευση, ειδικότερα στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν την υψηλότερη δόση iprodione ($\times 100$), του 3,5-DCA. Το συγκεκριμένο ισομερές της δίχλωροανιλίνης αποτελεί το κύριο προϊόν μεταβολισμού του iprodione στο έδαφος (Athiel et al. 1995; Campos et al. 2015). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το 3,5-DCA εμφανίζει τοξικότητα στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Rochkind et al. 1985).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή του iprodione μπορεί να αλλάξει τη δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους όταν εφαρμοστεί σε συγκεντρώσεις ως και $\times 10$ της συνιστώμενης (Wang et al. 2004; Minambres et al., 2010; Verdenelli et al. 2012). Αντίθετα ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση του iprodione στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους και ειδικότερα στην αφθονία και λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του iprodione αλλά ούτε και του 3,5-DCA, που παράχθηκε σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, στην λειτουργία και την αφθονία των AOA και AOB. Προηγούμενες μελέτες από τους Pappola et al. (2014) σε έδαφος από την Ιταλία και με ανάλογο πειραματικό σχεδιασμό με αυτό της παρούσας μελέτης

έδειξαν μια ξεκάθαρη θετική συσχέτιση μεταξύ της συσσώρευσης 3,5-DCA στο έδαφος και αναστολής της δυνητικής νιτροποίησης αλλά και άλλων μικροβιακών ενζύμων. Η έλλειψη αρνητικών επιδράσεων του iprodione αλλά και του 3,5-DCA στη λειτουργία και αφθονία των ΑΟΑ και ΑΟΒ στην παρούσα μελέτη είναι πιθανό να οφείλεται στην παραγωγή χαμηλών συγκεντρώσεων 3,5-DCA (max 3.5 mg/kg) σε σύγκριση με αυτή των Pappola et al. (2014) όπου καταγράφηκαν συγκεντρώσεις 3,5-DCA της τάξης των 90 mg/kg στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή της x100 δόσης του iprodione.

Συνολικά η εφαρμογή του iprodione σε δόσεις έως και x100 της συνιστώμενης δεν είχε αρνητικές επιδράσεις στη λειτουργία και αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών ανεξάρτητα από την προσθήκη ή όχι αμμωνιακής λίπανσης στο έδαφος. Η απουσία αρνητικών επιδράσεων στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς πιθανότατα οφείλεται στο σχηματισμό στο έδαφος χαμηλών συγκεντρώσεων 3,5-DCA που δεν φαίνεται να έχουν ανασταλτική δράση στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην αξιολόγηση της επίδρασης του ίδιου του 3,5-DCA (με εφαρμογή του απευθείας στο έδαφος) στην λειτουργία και αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arp, D. J., and L. Y. Stein, 2003. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38:471-495.
- Arp, D. J., and P. J. Bottomley, 2006. Nitrifiers: more than 100 years 6-0111 isolation to genome sequences. *Microbe* 1:229-234.
- Arp, D. J., P. S. G. Chain, and M. G. Klotz, 2007. The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 61:21-58.
- Athiel P., Mercadier C., Vega D., Bastide J., Davet P., Brunel B., Marel JC. Sept, 1995. Degradation of Iprodione by a Soil Arthrobacter-Like Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3216–3220.
- Avrahami, S., and R. Conrad., 2005. Cold-temperate climate: a factor for selection of ammonia oxidizers in upland soil? *Can.J. Microbiol.* 51:709-714.
- Belafdal O., Bergon M., Calmon M., Calmon JP., 1989. Kinetics and Mechanisms of Cyclization in Acidic Media of N-[(3,5-Dichloroanilino)carbonyl]-N-[(isopropylamino)carbonyl]glycine to Hydantoins: Iprodione and Its Isomer J. *Org. Chem.* 54, 4193-4198.
- Blystone CR., Lambright CS., Furr J., Wilson VS., Gray LE Jr., 2007. Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931804"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931804) *Toxicol Lett.*, 174(1-3):74-81.
- Bruns, M. A., J. R. Stephen, G. A. Kowalchuk, J. I. Prosser, and E.A. Paul., 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2994-3000.
- C´aceres, T.P.; He, W.; Megharaj, M.; Naidu, R. Effect of insecticide fenamiphos on soil microbial activities in Australian and Ecuadorean soils. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 2009, 44, 13–17.
- Campos M, C. Perruchon, S. Vasilieiadis, U. Menkissoglu-Spiroudi, D.G. Karpouzas, M.C. Diez, 2015. Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3,5-dichloraniline *International Biodeterioration & Biodegradation*
- Campos M., Karas P., Perruchon C., Papadopoulou E.S., Christou V., Menkissoglou-Spiroudi U., Diez M.C., Karpouzas D.G., (2017) Novel insights into the metabolic pathway of iprodione by soil bacteria. *Environmental Science and Pollution Research* doi:10.1007/s11356-016-7682-1
- Chao Yang, Chantal Hamel, Vladimir Vujanovic, and Yantai Gan, 2011. Fungicide: Modes of Action

- and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. International Scholarly Research Network, ISRN Ecology Volume, Article ID 130289, 8 pages
- Charles R. Worthing, R.J Hance, 1991. The Pesticide manual: a world compendium. British Crop Protection Council.
- Chen, W.C.; Yen, J.H.; Chang, C.S.; Wang, Y.S. Effects of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 2009, 72, 120–127
- Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold G, Albertsen M, Jehmlich N, et al. (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria *Nature* 528(7583):504–509
- De Boer, W., and G. A. Kowalchuk, 2001. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 33:853-866.
- DeLong, E. F., 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89:5685-5689.
- Di HJ, et al. 2009. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nat. Geosci.* 2:621– 624
- Dubey, H. D. & Rodrigues, R. L., 1970. Effect of dyrene and maneb on nitrification and ammonification and their degradation in tropical soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34 435-9.
- Fierer, N., K. M. Carney, M. C. Horner-Devine, J. P. Megonigal., 2009. The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. *Microbiol. Ecol.* 58:435-445.
- FOCUS (2006). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006, 434 p
- Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM., 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J* 1: 19–27.
- Grabke Anja Dolores Fernández-Ortuño Achour Amiri Xingpeng Li Natália A., Peres Powell Smith Guido, 2014. Characterization of Iprodione Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry and Blackberry. *Schnabel* Volume 104, Number 4 Pages 396-402.
- Hansel, C. M., S. Fendorf, P. M. Jardine, C. A. Francis, 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1620-1633.
- Hatzenpichler, R., E. V. Lebedeva, E. Spieck, K. Stoecker, A. Richter, H. Daims, M. Wagner., 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105:2134-2139.

- Hatzenpichler R (2012) Diversity, physiology and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(21): 7501-7510
- He, J., J. Shen, L. Zhang, Y. Zhu, Y. Zheng, M. Xu, H. J. Di., 2007. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ. Microbiol.* 9:2364-2374.
- Hernández, M., Jia, Z., Conrad, R., Seeger, M., 2011. Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 511e519.
- Hirota, R., A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, J. Kato., 2006. Transcriptional analysis of the multicopy hao gene coding for hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:1875-1881.
- Hooper, A. B., T. Vannelli, D. J. Bergmann, and D. M. Arciero, 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71: 59.
- Houghton, S. and Cockerill, F., 2006. RealTime PCR: Overview and applications. *Surgery.* 139,(1):1-5.
- Hunt, M., 2006. Real Time PCR Tutorial, University of South Carolina. Jena, P.K.; Adhya, T.K.; Rajaramamohan, Rao, V. Influence of carbaryl on nitrogenase activity and combinations of butachlor and carbofuran on nitrogen-fixing micro-organisms in paddy soils. *Pestic. Sci.* 1987, 19, 179–184.
- Jia Z, Conrad R. 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ. Microbiol.* 11:1658–1671.
- Julliard, H., 1994. The mechanism of action of iprodione. <http://www.iprodione.free.fr/Mechanism%20of%20action%20of%20Iprodione.htm>
- Kaufman D. D., 1987. Accelerated degradation of pesticides in soil and its effect on pesticide efficacy. *Proceedings British Crop Protection Conference – Weeds* 2, 515-522.
- Kormondy, E. J., 1976. *Concepts of Ecology*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Konneke, M., A. E. Bernhard, J. R. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury, and D. A. Stahl., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546.
- Kowalchuk, G. A., and J. R. Stephen, 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:485-529.
- Lal, R., Kimble, J., and Stewart, B. A., 1995. World Soils as a sink for radio-active gases, in: *Soil management and greenhouse effect*, edited by: Jorgensen, B. B., Lewis, London, 1–7.
- Lebedeva, E.V., M. Alawi, C. Fiencke, B. Namsaraev, E. Bock, and E. Spieck, 2005. Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiol.*

Ecol. 54, 297-306.

- Leininger, S., T. Urich, M. Schlöter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, C. Schleper, 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806.
- Li, X.; Zhang, H.; Wu, M.; Zhang, Y.; Zhang, C. Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. *J. Environ. Sci.* 2008, 20,619–25.
- Ludvigsen, G.H., Vandsemb, S., Lode, O., 2004. Pesticider i avrenning fra norske golfbaner. Vanni 2, (in Norwegian).
- Malhi SS, McGill W, 1981. Nitrification in three Alberta soils: effects of temperature, moisture and substrate concentration. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 14, pp. 393-399.
- Martin, C., and P. Davet, 1986. Biodegradation d'imides cycliques dans le sol et differences d'efficacité pratique observées sur le *Sclerotinia minor*. *Def. Veg.* 242:26–29.
- Martin, C., P. Davet, D. Vega, and C. Coste. 1991. Field effectiveness and biodegradation of cyclic imides in lettuce field soils. *Pestic. Sci.* 32:427–438.
- McGuire, M.J., Lieu, N.I., Pearthree, M.S., 1999. Using Chlorite Ion to Control Nitrification. *Journal AWWA*, 91:10:52.
- McGuire, M.J., Wu, X., Blute, N.K., Askenaizer, D., Qin, G., 2009. Prevention of Nitrification Using Chlorite Ion: Results of a Demonstration Project in Glendale, Calif. *Journal AWWA*, 101:1047.
- Mercadier, C., Vega, D., Bastide, J., 1997. Iprodione degradation by isolated soil microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 207-215.
- Miñambres G. G., M. Y. Conles, E. I. Lucini, R. A. Verdenelli, J. M. Meriles, and J. A. Zygodlo, 2010. Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no. 1, pp. 161–170.
- Miteva, V., T. Sowers, and J. Brechley, 2007. Production of N₂O by ammonia oxidizing bacteria at subfreezing temperatures as a model for assessing the N₂O anomalies in the Vostok ice core. *Ceomicrobiol. J.* 24, 451-459.
- Moir JWB., Crossman LC., Spiro S., Richardson DJ., 1996. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett* 387: 71–74.
- National Library of Medicine 1992. Hazardous Substance Databank. Iprodione
- Nicol, G. W., and C. Schleper., 2006. Ammonia-oxidising crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol.* 14:207.
- Norton, J. M., M. G. Klotz, L.Y. Stein, D. J. Arp, P. J. Bottomley, P. S. G. Chain, L. J. Hauser, M. L.

- Land, F. W. Larimer, M. W. Shin, and S. R. Starkenburg, 2008. Complete genome sequence of *Nitrosospira rutilans*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3559-3572.
- Nugroho, R. A., W. F. M. Roling, A. M. Laverman, H. A. Verhoef, 2007. Low nitrification rates in acid Scots pine forest soils are due to pH-related factors. *Microbiol. Ecol.* 53:89-97.
- Ochiai N., M. Fujimura, M. Oshima et al., 2002. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 66, no. 10, pp. 2209–2215.
- Papadopoulou E., Karas P., Nikolaki S., Storck V., Ferrari F., Trevisan M., Martin-Laurent F., Karpouzas D.G., (2016) The dissipation and adsorption of isoproturon, chlorpyrifos, tebuconazole and of their main metabolites: A lab-to-field assessment. *Science of the Total Environment* 569-570:86-96
- Pappola A., Ferrari A, Pertile G, Puglisi E., Suci N., Lamastra L., Vasileiadis S., Fornasier F., D.G. Karpouzas, M. Trevisan (2014) Assessing the soil microbial toxicity of iprodione using advanced biochemical and molecular tools: Put the blame on the metabolite 3,5 dichloroaniline. 13th IUPAC International Symposium of Pesticide Chemistry, San Francisco, USA, poster No. 100 p. 25
- Pereira e Silva MC, Semenov AV, Schmitt H, van Elsas JD, Salles JF. 2013. Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning. *Soil Biol Biochem* 57:995–1002. [http:](http://)
- Pospíšil, L., R. Sokolova, M.P. Colombini, S. Giannarelli, R. Fuococa J., 1999. Electrochemical properties of three dicarboximide type pesticides: vinclozoline, iprodione and procymidone. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 472, 33–41
- Poughon, L., C. G. Dussap, and J. B. Gros, 2001. Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Bioeng.* 72:416-433.
- Prosser, J. I., and T. M. Embley, 2002. Cultivation based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 813,165-179.
- Prosser JI, Nicol GW, 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environ Microbiol* 10: 2931–2941.
- Puglisi, E., Vasiliadis, S., Demiris, C., Bassi, D., Karpouzas, D.G., Capri, E., Cocconcelli, P.S., Trevisan, M., 2012. Fungicides impact on the diversity and function of non-target ammonia oxidizing microorganisms residing in a litter soil cover. *Microb. Ecol.* 64, 692e701.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H. P. Koops, M. Wagner, 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA

- A and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5368-5382.
- Purkhold, U., M. Wagner, G. Timmermann, A. Pommerening-Roser, and H. P. Koops, 2003. 16srRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing iso-54 lates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1485-1 494.
- Robertson, G. P., 1989. Nitrification and denitrification in humid tropical ecosystems. In “Mineral Nutrients in Tropical Forest and Savanna Ecosystems” (J. Proctor, ed.), pp. 55–70. Blackwell Sci.,Cambridge, UK.
- Robertson, G.P., T.W. Bruulsema, R.J. Gehl, D. Kanter, D.L. Mauzerall, C.A. Rotz, and C.O. Williams, 2012. Nitrogen-climate interactions in US agriculture. *Biogeochemistry* 114: 41-70.
- Rochkind, M.L., Blackburn, J.W., Sayler, G.S., 1986. Microbial Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, pp. 115e128.
- Rotthauwe J-H, Witzel K-P, Liesack W, The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia oxidizing populations, *Appl Environ Microbiol* 63 (1997), 4704–4712.
- Rousidou C, Papadopoulou E.S. , Kortsinidou M. , Giannakou I.O., Singh B.K., Menkissoglu-Spirodi U., Karpouzas D.G., 2013. Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biology & Biochemistry* 67, 98-105
- Shears, J. H., and P. M. Wood, 1986. Tri- and tetramethylhydroquinone as electron donors for ammonia monooxygenase in whole cells of *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 33:281-284.
- Slade, E., Fullerton, R., Stewart, A., Young, H., 1992. Degradation of the dicarbox- imide fungicides iprodione, vinclozolin and procymidone in Patumahoe clay loam soil, New Zealand. *Pesticide Sci.* 35, 95-100.
- Snyder L. R., J.J. Kirkland, and J. W. Dolan, 2009. Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, New York.
- Sorokin, D., T. Tourova, M. C. Schmid, M. Wagner, H. P. Koops, J. G. Kuenen, and M. Jetten, 2001. Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. *Arch. Microbiol.* 176:170-177.
- Stratagene, La Jolla, CA. 2006. Introduction to Quantitative PCR
- Stromqvist, J., Jarvis, N., 2005. Sorption, degradation and leaching of the fungicide iprodione in a golf green under Scandinavian conditions: measurements, modelling and risk assessment.

- Tilman D. 2001. Diversity and Productivity in a Long-Term Grassland Experiment. *Science* 294, 843
- Todd A., 2010. Disease on potatoes: The effect of anastomosis groups, fungicides and zinc on diseases. Thesis (Ph.D.), University of Adelaide, School of Agriculture, Food and Wine.
- Tourna, M. 2007. Functional diversity of ammonia oxidising bacteria and archaea. Thesis (Ph.D.), University of Aberdeen
- Tourna, M., T. E. Freitag, G. W. Nicol, J. I. Prosser, 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ. Microbiol.* 10, 1357-1364.
- Treusch, A. H., S. Leininger, A. Kletzin, S. C. Schuster, H. P. Klenk, and C. Schleper, 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* 7:1985-1995.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA et al., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74.
- Verdenelli RA, Lamarque AL, Meriles JM (2012) Short-term effects of combined iprodione and vermicompost applications on soil microbial community structure. *Science of the Total Environment* 414: 210-219
- Vitousek P.M., Mooney H.A., Lubchenco I., Melillo J.M. 1997. *Science* Vol. 277, Issue 5325, pp. 494-499
- Walker, A., 1987. Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pestic. Sci.* 21:219–231.
- Walker, A., and S. J. Welch, 1990. Enhanced biodegradation of dicarboximide fungicides in soil. In *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*, Chapter 5, pp 53–67, Chapter DOI: 10.1021/bk-1990-0426.ch005, ACS Symposium Series, Vol. 426.
- Wang, M.C.; Gong, M.; Zang, H.B.; Hua, X.M.; Yao, J.; Pang, Y.J.; Yang, Y.H. Effect of methamidophos and urea application on microbial communities in soils as determined by microbial biomass and community level physiological profiles. *J. of Environ. Sci. Health, Part B* 2006, 41, 399–341.
- Wang YS, Wen CY, Chiu TC, Yen JH (2004) Effect of fungicide iprodione on soil microbial community. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 59(1): 127-132
- Ward, B. B., and G. D. O'Mullan, 2002. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceanus*, a marine ammonia-oxidizing gamma-proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and amoA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4153-4157.
- Ward B.B., Arp D.J., and Klotz M.G 2011. Nitrification

- Wessen E, Hallin S. 2011. Abundance of archaeal and bacterial ammoniaoxidizer possible bioindicator for soil monitoring. *Ecol Indic* 11:1696–1698.
- Wong, M., L. and Medrano, J., F., 2005. Real Time PCR for m-RNA quantitation. *Biotechniques*, Vol.39, No1.
- Wood, P. M., 1986. Nitrification as a bacterial energy source, p. 39-62. In J. I. Prosser (ed.), *Nitrification*. IRL Press, Oxford, United Kmgdom.
- Yamagata, A., R. Hirota, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake, 2000. Mutational analysis of the multicopy hao gene coding for hydroxylanone oxidoreductase in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1754-1757.
- Yourman LF, Jeffers SN., Dean RA., 2000. Genetic Analysis of Isolates of *Botrytis cinerea* Sensitive and Resistant to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. *Phytopathology* 90(8):851-9.